

DIVERSIDAD Y RAZAS DE *Cladosporium fulvum*, EL AGENTE CAUSAL DEL MOHO DE LA HOJA DEL TOMATE

César Gustavo Lucentini¹, Rocío Medina², María Inés Troncozo³, Silvina Marianela Yanil Lopez⁴, Mario Emilio Ernesto Franco⁵, Cristina Rollan⁶, Lia Ronco⁷, Mario Carlos Nazareno Saparrat⁸, Pedro Alberto Balatti⁹.

¹ Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales (FCAyF), Universidad Nacional de La Plata (UNLP)- Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA); lucentinigustavo@gmail.com

² CIDEFI (FCAyF-UNLP)- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, (CONICET); rociomedinalp@gmail.com

³ Cátedra de Microbiología Agrícola (CMA)-(FCAyF-UNLP); mariainestroncozo@hotmail.com

⁴ CIDEFI (FCAyF-UNLP)-CONICET; smyld03@hotmail.com

⁵ CIDEFI (FCAyF-UNLP)-CONICET; ernesfranco@hotmail.com

⁶ CIDEFI (FCAyF-UNLP-CICBA), Cátedra de Fitopatología Vegetal (CFV)-(FCAyF-UNLP); rollanc@gmail.com

⁷ CIDEFI (FCAyF-UNLP- CICBA), CFV (FCAyF-UNLP); liaronco@gmail.com

⁸ CMA (FCAyF-UNLP), Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE, CONICET-UNLP), Instituto Spegazzini, Facultad de Ciencias Naturales y Museo-UNLP; masaparrat@yahoo.com.ar

⁹ CIDEFI (FCAyF-UNLP- CICBA), CMA (FCAyF-UNLP); pbalatti@gmail.com

RESUMEN

Cladosporium fulvum es el agente causante del “Moho de la hoja de tomate”, una de las patologías del cultivo de tomate bajo cubierta en el cinturón hortícola platense (Argentina). En estudios previos se determinó que en las áreas de producción muestreadas sólo se encuentran dos razas del hongo, la “0” y la “2”, y que los aislados presentan polimorfismo a nivel de los genes *avr*. Estos resultados sugieren la ocurrencia de procesos evolutivos o cambios genéticos cuyo resultado sería la aparición de una nueva raza. Por ello, el objetivo de este trabajo es conocer más sobre la diversidad de las poblaciones del patógeno que se encuentran en las áreas de cultivos hortícolas. Para ello se realizaron más aislados del patógeno y por medio de la Multiplex PCR se identificaron las razas a las que pertenecen. Además, se evaluó la diversidad genética con marcadores ISSR. La amplificación de los genes de avirulencia confirmó que los aislados son *C. fulvum*. Se determinó que prevalece la raza “2” sobre la “0” en un 81%. Se encontró un polimorfismo de 52,9% entre los amplicones de ISSR lo que sugiere que la diversidad de la población es considerable, la que resulta de cambios a nivel genético, que ocurren en el genoma, entre otros sitios en los *avr*.

PALABRAS CLAVES

Cladosporiosis; Polimorfismo; Razas; *Solanum lycopersicum*; Diversidad

INTRODUCCIÓN

La superficie cultivada con hortalizas en la Argentina es de aproximadamente 143.894.000 m² a campo y 11.858.468 m² son bajo cobertura (10 %) según los datos del Censo Nacional Agropecuario (CNA, 2010) realizado por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. El tomate es el segundo cultivo hortícola en importancia después de la papa, se producen aproximadamente unas 750.000 tn/año en una superficie superior a las 98.000 ha. La superficie cultivada en la Provincia de Buenos Aires con tomate (*Solanum lycopersicum* Miller) a campo es de aproximadamente 6.535.000 m² y en cultivo protegido bajo cubierta de 4.083.690 m² (62 %; CNA, 2010). Los cultivos en invernáculo están expuestos a estreses bióticos y abióticos que alteran el crecimiento del cultivo comparado con el cultivo a campo. Entre los problemas fitosanitarios que afectan al cultivo de tomate bajo cubierta, las enfermedades provocadas por los hongos ocupan un lugar preponderante por la diversidad de agentes patógenos y su carácter endémico (Jones et al., 2014). En los últimos años, el moho de la hoja (*Cladosporium fulvum* Cooke, sinónimo *Passalora fulva* (Cooke); U. Braun & Crous) y la mancha gris de la hoja (*Stemphylium lycopersici* (Enjoji); W. Yamam.) han sido algunas de las patologías más severas en los cultivos de tomate bajo cubierta (Thomma et al., 2005; Ronco et al., 2008).

C. fulvum es un hongo que pertenece a la familia *Mycosphaerellaceae* (Capnariales, Goodwin et al., 2001; Braun et al., 2003). El micelio de este hongo coloniza las hojas de tomate desarrollando en los espacios intercelulares, en etapas mas avanzadas produce conidióforos, de aproximadamente 200 µm de largo, que aparecen por los estomas (De Wit, 1992). En estos últimos se generan los conidios de color marrón oscuro a claro, que son los que dispersan la patología en el cultivo. El hongo sobrevive sobre los residuos del cultivo y/o en el suelo como saprótrofo, en estado conidial o en estructuras de resistencia como los esclerocios (Braun et al., 2003).

Aunque *C. fulvum* afecta principalmente a las hojas, ataca a las más viejas, ocasionalmente, los tallos, las flores, los pecíolos y raramente los frutos son afectados (Ellis, 1971; Holliday & Mulder, 1976; Curtis et al., 1994; Fox, 1997; Jones et al., 1994; Ho et al., 1999; Jones et al., 2014). Los primeros síntomas de la enfermedad son la aparición de manchas cloróticas en el haz de las hojas y en el envés se ve un aterciopelado pardo oliváceo que corresponde a los conidióforos del hongo (Blacard, 1992; Thomma et al., 2005). En etapas avanzadas, los conidióforos obstruyen los estomas, impidiendo la respiración y la transpiración de la planta

(Butler & Jones, 1949; Chupp & Sherf, 1960). En ataques severos las hojas se marchitan y mueren, la planta se desfolia y eventualmente puede morir (Jones et al., 1997; De Wit et al., 2002).

El patosistema *C. fulvum*-tomate es un modelo de estudio que se ajusta a la hipótesis gen a gen; esto es que cuando un gen de resistencia del tomate reconoce un gen de avirulencia del hongo, se genera una reacción de incompatibilidad, lo que impide que las plantas se enfermen (Flor, H. H. 1971; De Wit, 1992; Joosten & De Wit, 1999). *C. fulvum* sintetiza un conjunto de proteínas que son secretadas al espacio apoplástico de las hojas de tomate de los cultivares susceptibles, que son factores de virulencia (Kruijt et al., 2005). Se han identificado en el genoma del hongo las secuencias que codifican estas proteínas (ECP); estos genes son *ecp1*, *ecp2*, *ecp4* y *ecp5* (*ecp*; Ackerveken et al., 1992; Ackerveken et al., 1993; Honee et al., 1994; Joosten et al., 1994; Esse et al., 2006; Bolton et al., 2008). Por otro lado, *C. fulvum* también produce otras proteínas o polipéptidos de avirulencia (AVR) que son extracelulares y que están codificados por los genes *avr2*, *avr4*, *avr4e* y *avr9* (*avr*; De Wit 2002; Westerink et al., 2004a; Rivas & Thomas 2005; Thomma et al., 2005).

Es importante destacar que en las plantas de tomate también se han identificado los genes de resistencia, denominados *Cf*, que reconocen a los efectores del hongo (Van Kan et al., 1991; Joosten et al., 1994; Luderer et al., 2002; Westerink et al., 2004b), estos genes se han incorporado al cultivar de tomate Money Makert que es susceptible a la enfermedad.

Las proteínas AVR y ECP son efectores que se identifican en base a la respuesta (compatible-incompatible) que se observa cuando el set de cultivares diferenciales de tomate del cultivar Money Maker (MM) se inoculan con una suspensión de conidios del patógeno. Por lo tanto, la compatibilidad e incompatibilidad de cada aislamiento fúngico con el panel de cultivares diferenciales de tomate permite determinar las razas de *C. fulvum*. (Lindhout et al., 1989; Rivas & Thomas, 2005).

El grupo de trabajo del CIDEFI ha realizado estudios de esta patología en el cinturón hortícola platense y ha descrito en estudios preliminares la presencia de solo dos razas del hongo, la 0 y la 2 (Rollan et al., 2013). En estos trabajos también se realizaron aportes claves para proseguir los estudios tendientes a manejar la enfermedad. Por un lado, se desarrolló una reacción de multiplex PCR, en la que a partir del ADN genómico del hongo se identifica rápidamente la raza (Medina et al., 2015). Este procedimiento molecular no demanda realizar inoculaciones de los aislados en los cultivares diferenciales de tomate Money Maker, lo que es laborioso y lento en el tiempo. Además, entre un número limitado de aislados, se observó la presencia de solo dos razas del hongo, y además que los *avr* de los aislados presentaron polimorfismos a nivel de los genes de avirulencia, lo que sugiere que las poblaciones están expuestas a procesos de cambios genéticos, que pueden llevar a la aparición de nuevas razas (Veloukas et al; 2007). Esto es particularmente alarmante ya que

Joosten et al. (1994) y Joosten et al. (1997) demostraron la ocurrencia de mutaciones puntuales en el gen *avr4*, y sugirieron que esto podría conducir a la aparición de alelos "virulentos" del gen, lo que podría estar ocurriendo en los cultivos de tomate de nuestro país. En base a lo expuesto el objetivo de este trabajo fue ampliar la colección de aislados de *C. fulvum* provenientes de diversas áreas de cultivo bajo cubierta de tomate con el fin de evaluar la diversidad de la población del hongo que enferma en la Argentina, con especial énfasis en los procedentes de la Provincia de Buenos Aires, así como identificar las razas prevalentes y su incidencia.

MATERIALES Y METODOS

Aislamiento, cultivo y caracterización morfológica de los hongos

A partir de hojas de tomate con síntomas y signos típicos del Moho de la hoja del tomate se obtuvieron cultivos monospóricos con una coloración púrpura en el medio agar-agua 2% siguiendo la metodología descrita por Rollán et al. (2013). Estos hongos fueron repicados en medio agar-extracto de papa-glucosa (APG) e incubados a 25 °C durante 30 días en oscuridad. Los cultivos monospóricos de los aislados fueron incorporados a la colección del CIDEFI. La identificación taxonómica de los aislados obtenidos se llevó a cabo sobre la base de características morfológicas y culturales (Ellis, 1971).

Extracción de ADN genómico y reacción en cadena de la polimerasa con *primers* homólogos a genes de avirulencia y de las secuencias intersatelitales repetitivas (ISSR)

Se extrajo ADN genómico de cada una de los aislados siguiendo el protocolo Wizard® Genomic DNA Purification kit, acorde con la metodología empleada por Medina et al. (2015). La calidad del ADN se evaluó haciendo una corrida electroforética del ADN suplementado con bromuro de etidio (10 %) en geles de agarosa al 0,7 % (p/v) a 90 V. La cantidad de ADN se confirmó en base al patrón de un marcador molecular de concentración conocida (Genoma del fago Lambda digerido con Hind III - Promega Biotech) utilizando el analizador de imágenes GeneTools (SYNGENE). Además la cantidad y la calidad del ADN extraído se estimaron a través de la absorbancia a 260 nm y su relación a 280 nm, respectivamente, usando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000.

Reacción en cadena de la polimerasa múltiple

El ADN genómico extraído se utilizó como molde para realizar la reacción en cadena de la polimerasa multiplex. Para esto se emplearon primers homólogos a los extremos 5' y 3' de los fragmentos que codifican los *avr* (*genes*), utilizando el programa de amplificación descrito por Medina et al. (2015), en un termociclador (modelo MultiGene™, Labnet

International, Inc). Las reacciones se realizaron con 40-80 ng de ADN genómico, en un volumen final de 15 µl usando una concentración de MgCl₂ de 1,5 mM (Inbio Highway), 0,20 mM de cada par de primers (correspondientes a *avr2*, *avr4*, *avr4e* y *avr9*, Tabla 1), 0,2 mM de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs, Inbio Highway), 1 U de ADN polimerasa T-Plus (Inbio Highway) y buffer de reacción (Inbio Highway). Las reacciones de amplificación se suplementaron con Bromuro de Etidio y se resolvieron por electroforesis a 90 V en agarosa al 1,5 % (p/v).

Reacción en cadena de la polimerasa de cada uno de los *avr*.

La amplificación de los *avr* se realizó en un volumen final de 15 µl en un termociclador (modelo Multigene™, Labnet International, Inc), empleando los primers detallados en la Tabla 1, siguiendo la metodología empleada por Stergiopoulos et al. (2007a). Las reacciones se realizaron empleando 40-80 ng de ADN molde, 1,5 mM MgCl₂ (Inbio Highway), 0,20mM de primers (correspondientes a *avr2*, *avr4*, *avr4E* y *avr9*, Tabla 1), 0,2 mM de dNTPs (Inbio Highway), 1 U de ADN polimerasa T-Plus (Inbio Highway) y 1X buffer de reacción (Inbio Highway).

Tabla 1. Primers empleados en la amplificación correspondiente a los genes *avr* y de las secuencias intersatelitales repetitivas (SSR).

Primer	Secuencia (5'-3')
<i>Avr2F</i>	CATCAGCATATCCTCTTCCATCC
<i>Avr2R</i>	CAGTACGTTCAAAAGCAGATAAGG
<i>Avr4F</i>	ACGGTAGGTCTGTACACGAGCC
<i>Avr4R</i>	ACCGAACTGGGTCATGGAATG
<i>Avr4eF</i>	GCCCGGTATATCGCTGTGC
<i>Avr4eR</i>	CGGAACCCCTGGCTGAGA
<i>Avr9F</i>	AATACAACCTTGAAACAGCTAGG
<i>Avr9R</i>	GGA CTCTACGGGGCTTGG
<i>GA5</i>	TCA(GT) ₈
<i>IA5</i>	ACA(CAA) ₅
<i>FA5</i>	TAC(GA) ₅
<i>LA5</i>	CAG(AAC) ₅

Reacción en cadena de la polimerasa para los ISSR

Con el fin de visualizar diferencias a nivel del genoma entre los aislados se realizaron amplificaciones de secuencias intersatelitales utilizando ADN genómico de cada aislado como molde y como primers secuencias de satélites (GA5, IA5, FA5, y LA5, Tabla 1). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 25 µl, en un termociclador (modelo Multigene™, Labnet International, Inc). Se tomó una alícuota del ADN extraído de dos representantes de la raza 2 y uno de la raza 0. La reacción se llevó a cabo utilizando 80 ng de ADN molde; 2,5 mM de MgCl₂ (Inbio Highway); 1 µM de primer (GA5, IA5, FA5 y LA5, Tabla 1); 0,2 mM de cada dNTP (Inbio Highway); 1X buffer de reacción (Inbio Highway) y 1,25 unidades de T-plus ADN polimerasa (Inbio Highway), siguiendo la metodología empleada por Franco et al. (2017). Solo se realizaron modificaciones en la fase de annealing que fue de 75 seg a 48°C para los primers GA5 e IA5 y del mismo tiempo a 53°C para los primers FA5 y LA5. Los productos de la amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1,5 % conteniendo 10 % de bromuro de etidio. Las bandas de ADN amplificadas se observaron en un transiluminador UV y las imágenes se procesaron en el analizador de imágenes SYNGENE utilizando el software GENETOOLS. En este se evalúan los polimorfismos entre los aislados. Los valores de similitud y las distancias genéticas de los patrones de bandas ISSR se calcularon utilizando el índice de similitud de Dice con el software Past3 (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). Este índice considera la presencia de la

banda como una similitud, lo que es función de la hibridación de los primers en los *loci* donde encuentran sitios homólogos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de nuevos aislados de *C. fulvum*

Los aislados CIDEFI 300, CIDEFI 301, CIDEFI 322, CIDEFI 327, CIDEFI 329 y CIDEFI 330 fueron recolectados en la campaña 2015-2016 y se incorporaron a la colección del CIDEFI iniciada en la campaña 2013. Así se incrementó el número de representantes de *C. fulvum* provenientes de diferentes sitios y ambientes (tipo de producción). La escasa eficiencia para aislar el hongo radica en el lento crecimiento de *C. fulvum in-vitro* en donde las colonias alcanzan 3 mm de diámetro a los 21 días de cultivo, lo que no fue modificado por la suplementación del medio con diversos componentes o condiciones ambientales de crecimiento. En estas condiciones con frecuencia los aislados se contaminan con organismos de crecimiento más rápido, lo que dificulta la obtención de cultivos axénicos.

Tabla 2. Sitio de aislamiento, año, cultivar de tomate y tipo de producción donde se obtuvieron los aislados de *Cladosporium fulvum* (cepário CIDEFI).

Aislado	Cultivar	Localidad	Tipo de producción	Año
CIDEFI300	Elpida	Los Hornos ¹	Convencional bajo cubierta	2015
CIDEFI301	Elpida	Abasto ¹	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI305	Colibrí	Arana ¹	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI307	Elpida	Bella Vista ²	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI309	Elpida	Arana ¹	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI318	Elpida	Etcheverry ¹	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI320	Keitor	Lavalle ²	Convencional bajo cubierta	2013
CIDEFI327	Banano	Abasto ¹	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI329	Banano	Abasto ¹	Orgánico bajo cubierta	2015
CIDEFI330	Elpida	Los Hornos ¹	Convencional bajo cubierta	2015
CIDEFI332	Elpida	Abasto ¹	Orgánico bajo cubierta	2015

¹Provincia de Buenos Aires. ²Provincia de Corrientes.

Identificación de las razas y análisis de la incidencia de *C. fulvum*

Con los cultivos monospóricos de los nuevos aislados se procedió a determinar la raza de los mismos mediante la multiplex PCR (Medina et al., 2015; Figura 1). Puesto que algunos aislados no pudieron ser identificados, se llevaron a cabo también PCRs tendientes a amplificar cada uno de los *avr* en forma aislada, utilizando el primers homólogo a cada uno de ellos en base a la reacción descrita. En todos estos ensayos se incluyeron como

controles internos de la reacción, mezclas utilizando ADN de aislados de referencia ya analizados (datos no mostrados)(Tabla 3).

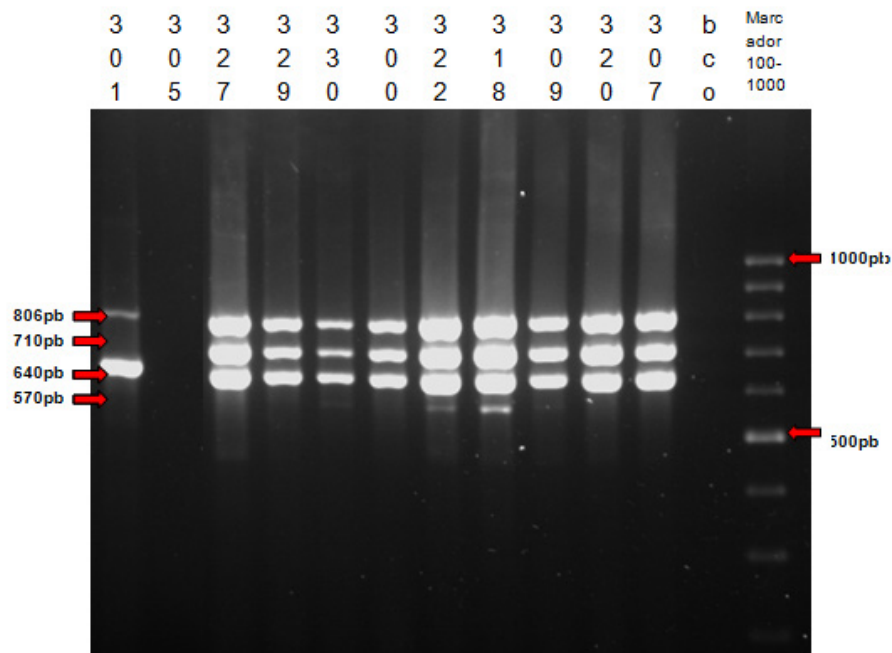


Figura 1. Productos de PCR multiplex utilizando el ADN de los nuevos aislados de *Cladosporium fulvum* (CIDEFI 300, CIDEFI 301, CIDEFI 322, CIDEFI 327, CIDEFI 329 y CIDEFI 330) y otros de referencia (CIDEFI 305, CIDEFI 307, CIDEFI 308, CIDEFI 309 y CIDEFI 318; Medina et al., 2015) y su comparación con el marcador molecular de 100pb a 1000pb (primer calle a la derecha).

Tabla 3. Identificación de las razas de los aislamientos presentados en este estudio, incluyendo aislamientos ya descriptos (Medina et al., 2015).

	<i>avr 2</i>	<i>avr 4</i>	<i>avr 4e</i>	<i>avr 9</i>					
Aislado	multiplex	multiplex	multiplex	multiplex	<i>avr2</i>	<i>avr4</i>	<i>Avr4e</i>	<i>avr9</i>	Raza
CIDEFI300		+	+	+		+	+	+	2
CIDEFI301		+	+				+	+	2
CIDEFI305						+	+	+	2
CIDEFI307		+	+	+					2
CIDEFI309		+	+	+					2
CIDEFI318	+	+	+	+	+	+	+	+	0
CIDEFI320		+	+	+					2
CIDEFI327		+	+	+					2
CIDEFI329		+	+	+			+	+	2
CIDEFI330		+	+	+					2
CIDEFI332	+	+	+	+	+	+	+	+	0

En el caso de las amplificaciones obtenidas se encontraron los patrones típicos de las razas ya descritas 2 y 0. Si bien el número de aislados es bajo, la raza 2 es la que prevaleció ya que presentó la mayor incidencia (81 %). Esto concuerda con lo descrito por Rollán et al. (2013) y Medina et al. (2015) que incluyeron un set de aislados del patógeno proveniente de sitios próximos a los muestreados. Asimismo, resulta interesante destacar que los aislados de la raza 0 aparecieron asociados al cultivar de tomate Elpida, cultivado tanto bajo manejo convencional como orgánico.

Estudio preliminar de semejanzas y diferencias genómicas empleando marcadores moleculares ISSR

Los estudios descritos por Medina et al. (2015) mostraron la ocurrencia de polimorfismos a nivel de los genes *avr*, sugiriendo la existencia de procesos que inducen cambios genéticos. Por ello, se analizó la diversidad de los aislados a nivel del genoma. Para ello se utilizaron los marcadores ISSR y los aislados CIDEFI 322 correspondiente a la raza 0 y CIDEFI 327 y 329 pertenecientes a la raza 2 (Figura 2).

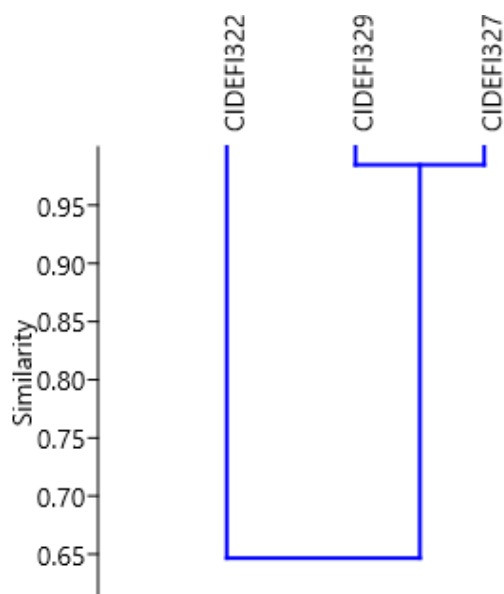


Figura 2. Dendrograma generado por análisis de cluster UPGMA usando el coeficiente de similitud de Dice basados en los patrones de bandas amplificados para los primers ISSR (GA5, IA5, FA5 y LA5) utilizando ADN de los aislados CIDEFI 322 (raza 0), CIDEFI 327 y CIDEFI 329 (raza 2).

Los cuatro primers ISSR utilizados amplificaron un total de 38 bandas definidas y reproducibles, las que tuvieron un tamaño aproximado de 400pb a 1800pb. Entre ellos, 18 amplicones fueron polimórficos (52,9 %). Con los datos de este análisis se construyó un

dendrograma en base al Algoritmo UPGMA (Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Mean) y con el coeficiente Dice. Los tres aislados de *C. fulvum* analizados se agruparon en un cluster con un coeficiente de similitud de 0,65 (Figura 2), sugiriendo que existe un nivel de variabilidad intraespecífica importante. Por otro lado, los aislados CIDEFI 327 y CIDEFI 329 tienen, tal cual era de esperar un coeficiente de similitud de 0,98, ya que son aislados de la misma raza que evidentemente presentan algunos polimorfismos en los *avr* y evidentemente también en otros sitios del genoma. Esta diversidad puede tener relación con la susceptibilidad a funguicidas y el tipo de manejo, ya que con frecuencia la respuesta a los funguicidas tiene una base genética. En estos momentos se están realizando trabajos para confirmar con el set de diferenciales los resultados encontrados.

CONCLUSIÓN

Entre los aislados de *Cladosporium fulvum* causantes del moho de la hoja del tomate solo se identificaron las razas 0 y 2.

Los materiales de tomate que se utilizan en la producción carecen de los genes de resistencia *Cf4*, *Cf5* y *Cf9* y por eso se enferman.

Existe un nivel considerable de diversidad en la población de *Cladosporium fulvum*; ésta resulta de cambios a nivel genético, que ocurren en el genoma incluyendo a los genes de avirulencia.

BIBLIOGRAFÍA:

- Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van; Joosten, M. H. A. J.; Muisers, J. M.; Verbakel, H. M y De Wit, P. J. G. M. de (1993): Characterization of two putative Pathogenicity genes of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6: 210-215.
- Ackerveken, G. F. J. M. van de; Kan, J. A. L. van; De Wit, P. J. G. M. (1992): Molecular analysis of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant Journal* 2 (3): 359-366.
- Blancard, D. (1992): Enfermedades del tomate. Observar, identificar y luchar. INRA. Ed. Mundi-Prensa, 212 p.
- Bolton, M. D; Esse, H. P; Vossen, J. H; Jonge, R; Stergiopoulos, I; Stulemeijer, I. J. E; Berg, G. C. M; Borrás-Hidalgo, O; Dekker, H. L; Koster, C. G; De Wit, P. J. G. M; Joosten, M. H.

- & Thomma, B. P. (2008): The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector *Ecp6* is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* 69(1), 119–136.
- Braun, U; Crous, P.W; Dugan, F; Groenewald, J.Z y Hoog, G.S. (2003): Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium-like hyphomycetes*, including *Davidiella* gen. Nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. Str. *Mycol. Progress* 2: 3-18.
- Butler, E. J y Jones, S.G. (1949): Tomato leaf mould, *Cladosporium fulvum* Cooke. Macmillan, London, pp. 123.
- CNA (2010). CNA. http://www.indec.gob.ar/cna_index.asp. Hortalizas por provincia y total. Accessed 2016.
- Chupp, C & Sherf, A.F. (1960): Vegetable disease and their control. Pp. 541-545.
- Curtis, M. D; Gore, J y Oliver, R.P. (1994): The phylogeny of the tomato leaf mold fungus *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* by analysis of rDNA sequences. *Current Genetic* 25: 318-322.
- De Wit, P. J. G. M. (1992). Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant-pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30: 391-418.
- De Wit, P. J., Brandwagt, B. F., Van den Burg, H. A., Cai, X., Van der Hoorn, R. A. L., De Jong, C. F. & Luderer, R. (2002): The molecular basis of co-evolution between *Cladosporium fulvum* and tomato. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81(1), 409-412.
- Ellis, M. B. (1971): *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew
- Esse, H. P., Thomma, B. P. H. J; Klosostwe, J. W, van't & De Wit, P. J. G. M (2006): Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplasto. *Journal of Experimental Botany* 57 (3): 599-608.
- Flor, H. H. (1971): Current status of the gene – for – gene concept. *Annu.Rev.Phytopathol.* 9: 275-296.
- Fox, R. T. V.1997: Fungal goes in your garden. 36. Leaf Moulds. *Mycologist* 11:88.

- Franco, M. E. E., Troncozo, M. I., López, S. M. Y., Lucentini, G., Medina, R., Saparrat, M. C. N. & Balatti, P. A. (2017): A survey on tomato leaf grey spot in the two main production areas of Argentina led to the isolation of *Stemphylium lycopersici* representatives which were genetically diverse and differed in their virulence. *European Journal of Plant Pathology*, 1-18.
- Goodwin, S.B.; Dunkle, L.D., Zismann, V.L. (2001): Phylogenetic analysis of *Cercospora* and *Mycosphaerella* based on the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Phytopathology* 91: 648–658.
- Ho, M. H. M; Castañeda, R. F. R; Dugan, F. M & Jong, S. C. (1999): *Cladosporium* and *Cladophialophora* in culture: descriptions and expanded Key. *Mycotaxon* 72: 115-157
- Honée, G., Van den Ackerveken, G. F., Van den Broek, H. W., Cozijnsen, T. J., Joosten, M. H., Kooman-Gersmann, M., ... & De Wit, P. J. (1994): Molecular characterization of the interaction between the fungal pathogen *Cladosporium fulvum* and tomato. *Euphytica*, 79(3), 219-225.
- Holliday, P & Mulder, J. L. (1976): C.M.I Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 48. *Fulvia fulva*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Jones, D. A; Thommas, C. M; Hammond-Kosak, K. E; Balint- Kurti, P. J y Jones, J. D. G. (1994): Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 226: 789-790.
- Jones J. B., Jones J. P., Stall R. E., Zitter T. A. (1997). *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul. MN: APS Press.
- Jones, J. B; Zitter, T. A.; Momol, T. M. & Miller, S. A. (2014): *Compendium of tomato diseases and pests*. Second Edition. APS Press, USA, 168p.
- Joosten, M. H. A. J; Cozijnsen, T. J & De Wit, P. J. G. M. (1994): Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* 367 384-386.

- Joosten, M. H., Vogelsang, R., Cozijnsen, T. J., Verberne, M. C., & De Wit, P. J. (1997): The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *The Plant Cell*, 9(3), 367-379.
- Joosten, M. H. A. J., & De Wit, P. J. G. M. (1999): The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: A versatile experimental system to study plantpathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 335-367
- Kan, J. A. L., Ackerveken, G. F. J. M., & De Wit, P. J. G. M. (1991): Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene *Avr9* of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:52-59.
- Kruijt, M., De Kock, M. J., & De Wit, P. J. (2005): Receptor - like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular plant pathology*, 6(1): 85-97.
- Lindhout, P.; Korta, W.; Cislik, M.; Vos, I. & Gerlagh, T. (1989): Further Identification of races of *Cladosporium fulvum* syn. *Fulvia fulva* on tomato originating from the Netherlands, France & Poland. *Neth. J. Plant Pathol.* 95:143-148.
- Luderer, R., Takken, F. L. W., De Wit, P. J. G. M., & Joosten, M. H. A. J. (2002): *Cladosporium fulvum* overcomes Cf-2-mediated resistance by producing truncated AVR2 elicitor proteins. *Mol. Microbiol.* 45: 875-884.
- Medina, R., López, S. M., Franco, M. E., Rollan, C., Ronco, B. L., Saparrat, M. C & Balatti, P. A. (2015): A Survey on Occurrence of *Cladosporium fulvum* Identifies Race 0 and Race 2 in Tomato-Growing Areas of Argentina. *Plant Disease*, 99(12), 1732-1737.
- Rivas, S. & Thomas, C. M. (2005): Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 395-436.
- Rollán, C.; Medina, R.; López, S.; Protto, V.; Vera Bahima, J.; Saparrat, M.; Ronco, L.; & Balatti, P. (2013): Identification of Races 0 and 2 of *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*) on Tomato in the Cinturón Hortícola de La Plata, Argentina. *Plant Disease* 97 (7): 992. Disease Notes (<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0987-PDN>).

- Ronco, L.; Rollán, C.; Larrán, S.; Mónaco, C.; & Dal Bó, E. (2008): Manual para el Reconocimiento de Enfermedades: TOMATE Y PIMIENTO – Cinturón Hortícola del Gran Buenos Aires. Ed. Universidad Nacional de La Plata, 56 pp. ISBN 978-950-34-0489-8.
- Stergiopoulos, I; De Kock, M. J. D; Lindhout, P. & De Wit, P. J. G. M. (2007a): Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *MPMI* Vol. 20, No. 10, pp. 1271–1283. The American Phytopathological Society.
- Thomma B.P.H.J., Van Esse P.H., Crous P.W. & De Wit P.J.G.M. (2005): *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*) a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic *Mycosphaerellaceae*. *Plant Molecular Pathology* 6, 379-393.
- Veloukas, T., Bardas, G. A., Karaoglanidis, G. S., & Tzavella-Klonari, K. (2007): Management of tomato leaf mould caused by *Cladosporium fulvum* with trifloxystrobin. *Crop Protection*, 26(6), 845-851.
- Westerink, N., Joosten, M. H. A. J., & De Wit, P. J. G. M. (2004a): Fungal virulence factors at the crossroads of disease susceptibility and resistance. In *Fungal disease resistance in plants: biochemistry, molecular biology, and genetic engineering* (pp. 93-137). The Haworth Press, Inc..
- Westerink, N., Brandwagt, B. F., De Wit, P. J. G. M., & Joosten, M. H. A. J. (2004b): *Cladosporium fulvum* circumvents the second functional resistance gene homologue at the *Cf-4* locus (*Hcr9-4E*) by secretion of a stable *avr4E* isoform. *Mol. Microbiol.* 54:533-545.